Aus der Universitäts-Frauenklinik Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Hans Roemer

Glycylglycin-Dipeptidase und Leucinaminopeptidase im Ovar des Menschen und des Schweines

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
GRETEL SCHWÄGERLE
aus Tübingen

1963

7632

Aus der Universitäts-Frauenklinik Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Hans Roemer

Glycylglycin-Dipeptidase und Leucinaminopeptidase im Ovar des Menschen und des Schweines

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
GRETEL SCHWÄGERLE
aus Tübingen

1963

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Dekan: Professor Dr.Dr. E. Fröhlich

I. Berichterstatter: Dozent Dr. G. Jung

II. Berichterstatter: Professor Dr. H. Roemer

Fotodruck PRÄZIS · Tübingen

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Die eiweißspaltenden Fermente	2
	1. Einteilung	2
	2. Exopeptidasen	2
	Dipeptidase	2
	Vorkommen	2
	pH-Optimum	3
	Kinetik der Dipeptidase	3
	Aminopeptidase	4
	pH-Optimum	4
	Stabilität der LAP	4
	Vorkommen der LAP	5
III.	Experimenteller Teil	
	A) Herstellung des Gewebshomogenates	6
	B) Herstellung der Fraktionen	6
	C) Bestimmung der Glycylglycin-Dipeptidase-Aktivität im Ovar	7
	D) Bestimmung der LAP-Aktivität	10
IV.	Ergebnisse	
	I. Dipeptidaseaktivität	13
	Dipeptidase im Schweineovar	14
	Dipeptidase im menschlichen Ovar	15
	Zusammenfassende Besprechung der Ergebnisse	18
	II. Leucinaminopeptidaseaktivität	
	1. Im Schweineovar	
	a) In der Follikelflüssigkeit	19
	b) Im Corpus rubrum und luteum	20
	c) Spezifische Aktivität der LAP im Schweineovar	20

Seite

2. LAP in menschlichen Gewebe 22
LAP im nicht pathologisch veränderten Ovar 22
LAP im Ovar bei verschiedenen pathologischen Befunden 23
LAP im Schwangerschaftsovar 24
LAP in den Fraktionen des carcinomatösen Ovars 25
Spezifische LAP-Aktivität in den Fraktionen des menschlichen Ovars 25
LAP im menschlichen Corpus luteum 26

Zusammenfassende Besprechung der Ergebnisse 27

V. Diskussion 28

VI. Zusammenfassung 31

VII. Literaturverzeichnis 32

I. EINLEITUNG

Im Jahre 1910 hat KNOBLANCK [20] eine proteolytische Aktivität im Ovar beschrieben. LOEB und GUTMANN [24] fanden neben einem pepsinähnlichen auch ein tryptisches Ferment, weiterhin Katalase, Diastase, Lipase und eine Lecithinase.
ROEMER [28] konnte 1946 im Harngesunder geschlechtsreifer Frauen abhängig vom ovariellen Cyclus an bestimmten Tagen ein spezifisches proteolytisches Ferment feststellen. Er nannte es Uro-Ovo-Proteinase. Es kann auf Grund von Untersuchungen von HELD und JUNG [16] angenommen werden, daß alle Fermente, damit auch diese Uro-Ovo-Proteinase, in den Granulosazellen der Follikel gebildet werden.
1958 untersuchte FUHRMANN [7] eiweisspaltende Fermente der weiblichen Genitalorgane besonders des Endometriums. 1959 folgten Versuche von JUNG, HELD, E. und A. KIDES [14], die nachweisen konnten, daß die spezifische Aktivität der proteolytischen Fermente im Ovar außerordentlich hoch ist, und die anderer Organe erheblich übertrifft.
Von diesen Autoren wird diskutiert, ob Proteinasen im Ovar spezifische Funktionen zu erfüllen haben, etwa im Zusammenhang mit dem Cyclus, bei der Bildung des Corpus luteum und der Follikelflüssigkeit. Weiterhin stellten obige Autoren die Frage, ob es sein könne, daß Enzyme die im Blut herbeigeführten Hormone chemisch verändern oder aber, ob gonadotrope Hormone als Enzymeffektoren im Ovar zur Wirkung kommen.
Wir haben die Aktivität verschiedener Peptidasen im Schweineovar und menschlichen Ovar untersucht. Diese Versuche sollten die bisherigen Ergebnisse über eiweisspaltende Enzyme ergänzen. Vor allem sollte dabei festgestellt werden, ob auch Peptidasen in so hoher Aktivität im Ovar nachzuweisen sind, wie dies bei Kathepsin der Fall ist. Gleichzeitig sollte bei unseren Versuchen die Peptidase-Aktivität des menschlichen Ovars bei verschiedenen pathologischen Veränderungen geprüft werden.

II. DIE EIWEISSSPALTENDEN FERMENTE

1) EINTEILUNG

Die eiweisspaltenden Fermente wurden früher im allgemeinen in 2 Gruppen eingeteilt, in Proteinasen und Peptidasen. Da sich in den letzten Jahren gezeigt hat, daß alle gut charakterisierten Proteinasen auch synthetische Peptide und ihre Derivate spalten können, unterscheidet man heute nach BERGMANN [2] zwischen den Endopeptidasen und den Exopeptidasen. Die Exopeptidasen wirken auf einfache Verbindungen, die eine oder mehrere freie terminale polare Gruppen besitzen, wie eine Amino- oder eine α -Carboxylgruppe oder beide. Im Gegensatz dazu können Endopeptidasen Verbindungen hydrolysieren, welche keine freien terminalen Amino- oder Carboxylgruppen besitzen, oder die polaren Gruppen an anderer Stelle als in α -Stellung zur Peptidbindung enthalten.
Die Endopeptidasen sind fähig, auf die zentrale Peptidbindung von Eiweißen oder auf substituierte Peptide der entsprechenden Konfiguration einzuwirken (SMITH [38]).
Die Exopeptidasen sind weitgehend mit den früher als Peptidasen, die Endopeptidasen mit den als Proteasen bezeichneten Fermente identisch. In diesen beiden Gruppen lassen sich dann weiterhin verschiedene Typen unterscheiden, abhängig vom Bau ihrer Substrate oder der Struktur derjenigen Stellen des Substrates, an der sie angreifen [22].

2) EXOPEPTIDASEN

Zu den Exopeptidasen gehören u.a. die Dipeptidasen, Aminopeptidasen, Carboxypeptidasen und Dehydropeptidasen. Wir haben eine Dipeptidase, die Glycylglycindipeptidase, und von den Aminopeptidasen die Leucinaminopeptidase im Ovar untersucht.

Dipeptidase

a) Vorkommen.

Die Dipeptidasen sind im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet. Besonders reichlich finden sie sich im Dünndarm, in der Niere, in den Fundusdrüsen des Magens, in der Hefe und in Schimmelpilzen, im Malz usw. [1]. In Kuhmilch kommt Dipeptidase nicht vor, während sie sich in Frauenmilch durch Spaltung von Glycyl-l-tryptophan nachweisen läßt und auf diese Weise eine Unterschei-

dung dieser beiden Milcharten gestattet [10].
Auch im Blutserum finden sich Dipeptidasen zusammen mit Aminopolypeptidase, und zwar in besonders hohem Maße bei fieberhaften Erkrankungen und bei Schwangerschaft [10].

b) Eigenschaften der Glycylglycindipeptidase

Die Dipeptidase ist verhältnismäßig empfindlich. Durch Glycerin läßt sie sich in wässeriger Lösung haltbar machen. Schwefelwasserstoff und Blausäure hemmen das Enzym vollkommen und sind schon in sehr geringer Konzentration wirksam. Eingehend untersucht ist das Verhalten gegen Metallionen. Während z.B. Hg^{++}, Ca^{++} hemmen, hat sich ergeben, daß andere Metalle, nämlich Co^{++}, Mn^{++}, Cystein, Zn^{++}, Mg^{++}, Fe^{++} als Aktivatoren wichtig sind.
Von SMITH [31] wird eine Glycylglycin spaltende Dipeptidase, die spezifisch durch Co^{++} und unvollkommen durch Mn^{++} aktiviert wird, von den für die Spaltung anderer Dipeptide, z.B. von Glycyl-l-Leucin verantwortlichen Enzymen unterschieden.

Das pH-Optimum

Das pH-Optimum der Glycylglycin-Dipeptidase liegt bei pH 7,6 (Smith [31]). Während bei Anwendung von Phosphatpuffer (Sørensen) das Wirkungsoptimum zwischen pH 7,2 und 7,8 liegt, erfolgt im Veronalpuffer (Michaelis) von pH 7,8 an die Bildung eines leicht abfallenden Plateaus.
Wird Glycylglycin mit Co^{++} bei pH 7,0 - 8,0 inkubiert, entwickelt sich eine rosa Farbe, die viel stärker ist, als die von Co^{++} allein oder von Co^{++} und Glycokoll oder von Glycylleucin [31]. Smith vermutet eine spezifische Komplexverbindung, bei deren Bildung Co^{++} als Brücke in der Enzym-Substrat-Verbindung dienen soll [32]. Diese Bindung ist stabil und zeigt nur geringe Tendenz zur Ionenbildung [33]. Außerdem deutet sie auf die Spezifität des Fermentes hin.

Kinetik der Dipeptidase

Die Kinetik der Dipeptidase ist vielfach untersucht worden, wobei teils Annäherungen an einen Reaktionsverlauf O. Ordnung, teils an einen monomolekularen Reaktionsverlauf festgestellt wurden. Nach GRASSMANN [11] ist die Kinetik abhängig sowohl von der Herkunft des Enzyms, der Enzymkonzentration und von der Natur des Substrats.
Die nach MICHAELIS ermittelte Affinität zum Substrat fällt in der Reihe Leucylglycin >Alanylglycin >Glycylglycin [25] und in der gleichen Reihenfolge findet man eine Änderung der Kinetik vom linearen zu mehr oder we-

niger gekrümmten Reaktionsverläufen. Durch anwesende Ionen, Aminosäuren, Verunreinigungen und Begleitstoffe wird die Kinetik beeinflußt.

Aminopeptidase

Die Leucinaminopeptidase (LAP) gehört zu den Aminopeptidasen. Sie wurde von LINDERSTRØM [23] zum ersten Mal 1929 im Darmerepsin nachgewiesen. Nach der Einteilung von BERGMANN ist die LAP identisch mit dem Kathepsin III. Das Enzym ist relativ unspezifisch. Es hydrolysiert mit verschiedener Geschwindigkeit den am Amino-Ende einer Kette befindlichen Aminosäurerest. Die genaue Bedeutung der LAP innerhalb des Stoffwechsels ist noch nicht bekannt. Wahrscheinlich bewirkt sie die Aufspaltung einer Peptidbindung in der Nähe eines l-Leucin-Restes oder die Übertragung von l-Leucin von einem Peptidmolekül auf ein anderes. Damit wäre sie an der Endphase der Eiweißaufspaltung mitbeteiligt.
Nach SPACKMANN [37] ist die LAP ein einfach zusammengesetztes Protein mit einem Molekulargewicht von 300 000.
Die LAP gilt als Metallprotein, da sie durch Metallgifte z.B. Cyanide oder Sulfide gehemmt wird. Das dialysierte und gereinigte Enzym wird entweder durch Mn^{++} oder Mg^{++} aktiviert (37, 34, 22).
Die Aktivierung hängt in starkem Umfang von der Reinheit der Präparate ab. Bei Verdünnung des Enzyms tritt Dissoziation ein ohne daß Mn^{++}-Überschuß auftritt. Dabei kann die Gleichgewichtskonstante der Reaktion

$$\text{Protein} + Mn^{++} \longleftrightarrow Mn^{++}\text{—Protein}$$

durch Änderung der Mn^{++} - Konzentration bei konstanter Proteinkonzentration untersucht werden. Unter den gewöhnlichen experimentellen Bedinungen erfolgt die Aktivierung durch Mn^{++} schneller als durch Mg^{++} [31].
In einigen Geweben scheint die LAP Mg^{++} zu enthalten, da ungereinigte Extrakte stark durch Zitrat gehemmt werden. Zitrat hemmt aber andere Mn^{++}-aktivierte Peptidasen nicht [31].

Das pH-Optimum

Das pH-Optimum der l-Leucinaminopeptidase liegt bei dem Enzym der Darmmucosa zwischen pH 8,0 und 9,0 (13, 31).
Die LAP aus Milz und Niere, die zum Kathepsinkomplex gerechnet werden, wirken optimal im schwach sauren pH bei 5,0.

Stabilität der LAP

FUHRMANN [7] untersuchte die Fermentbeständigkeit der LAP des Endometriums. Es wurden in mehreren Versuchen die Enzymaktivität sowohl unmittelbar nach Gewebsentnahmen als auch nach verschiedenlanger Aufbewahrung bei 50° C bestimmt.

Die LAP ist zunächst sehr stabil. Erst nach 4 Tagen ist ein deutlicher Aktivitätsabfall (16 %) erkennbar. Nach drei Wochen ist die Aktivität um 81 % gefallen.

Vorkommen der LAP

Beim Menschen lassen sich die höchsten Fermentaktivitäten im Gehirn (Occipitalrindenregion) nachweisen. Sie nehmen dann weiter in folgender Reihenfolge ab: Duodenum, quergestreifte Muskulatur, Ileum, Niere, Colon, Milz, Prostata, Hoden, Leber, Magenschleimhaut, Pankreas, Aorta, Urinblase, Mammadrüsengewebe, Thymus (Neugeborenes), Fettgewebe, Oesophagus und Uterus [12].

Außer im menschlichen Serum ist das Enzym im Urin, Magen- Gallen- und Duodenalsaft, in der Pleura- und Peritonealflüssigkeit, sowie im Rückenmarksliquor gefunden worden [29]. Über erhöhte Enzymaktivität im Serum von unterschiedlichem Ausmaß wurde bisher bei fortgeschrittener Gravidität [9, 12], Lebererkrankungen [6], verschiedenen Hautefloreszensen [3] und vereinzelt bei malignen Tumoren im Mund- und Halsbereich [4] berichtet. FUHRMANN [7] fand im Endometrium des Menschen während der Proliferationsphase eine LAP-Aktivität von 3,46 mg β -NA / mg N/h und während der Sekretionsphase eine solche von 7,74 mg β -NA / mg N/h. Die Untersuchung von sechs glandulär-hyperplastischen Endometrien ergab eine durchschnittliche spezifische Aktivität von 5,84 LAP-Einheiten. Das ist auf jeden Fall eine höhere Aktivität als während der Proliferationsphase.

Die Glycylglycindipeptidase-Aktivität des Endometriums ist während der Sekretionsphase ebenfalls höher als in der Proliferationsphase. Sie beträgt während der Proliferation 0,56, während der Sekretionsphase 2,06 Einheiten.

III. EXPERIMENTELLER TEIL

A HERSTELLUNG DES GEWEBSHOMOGENATES

Wir haben uns bei der Aufarbeitung des Gewebes an die Angaben von LANG und SIEBERT [21] gehalten. Sofort nach der Operation wurden die Ovarien verarbeitet oder, wenn dies nicht möglich war, bis zu einem Tag in der Kühltruhe bei -20° C aufbewahrt.
Um ein Homogenat herzustellen, wurde das Gewebe gewogen, mit der Schere möglichst klein zerschnitten, dann mit 2 Gewichtsteilen- in seltenen Fällen, wenn sehr wenig Gewebe zur Verfügung stand, mit 3 Gewichtsteilen- einprozentiger KCl-Lösung vermischt und homogenisiert. Der so entstandene Gewebsbrei wurde durch ein dichtes Tuch gepreßt und dadurch von Bindegewebe befreit. Dieses Homogenat wurde mit physiologischer NaCl-Lösung im Verhältnis 1 : 5, 1 : 10 und eventuell 1 : 20 verdünnt und zu den Versuchen verwendet.
In einem Fall (Pat. Maria L., 39 Jahre, Ovarial-Ca.) wurde das Gewebe nicht mit KCl sondern mit 30 %iger Rohrzuckerlösung im Verhältnis 1 : 3 homogenisiert und dann fraktioniert.

B HERSTELLUNG DER FRAKTIONEN

Ein Teil des Homogenates wurde dazu mit 3 Teilen 30 %iger Rohrzuckerlösung verdünnt und dann bei 650 g zehn Minuten lang zentrifugiert. Dadurch sedimentierten die Zellkerne. Die Zellkerne wurden zweimal in 30 %iger Rohrzuckerlösung aufgeschwemmt, zentrifugiert und so gewaschen. Danach konnten sie in entsprechender Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung zu den Versuchen verwendet werden.
Wir haben die Kerne auf 10 ml aufgefüllt verwendet.
Der Überstand ($Ü_1$) wurde bei 24 000 g in einer gekühlten Zentrifuge eine halbe Stunde zentrifugiert.
Das so gewonnene Sediment, die Mitochondrien, wurden ebenfalls auf 10 ml mit physiologischer KCl-Lösung aufgefüllt und, wenn es nötig war, noch 1 : 5 verdünnt.
Der Überstand II ($Ü_2$), der aus Cytoplasma und Mikrosomen bestand, wurde für die Fermentansätze 1 : 5 verdünnt.
Zur Ergänzung der Untersuchungen am menschlichen Ovar wurden noch Schweineovarien untersucht. Die Aufarbeitung war dieselbe wie beim menschlichen Organ.

C BESTIMMUNG DER GLYCYLGLYCINDIPEPTIDASE-AKTIVITÄT IM OVAR

Die Aktivität der Glycylglycindipeptidase (GG-Dipeptidase) wurde nach den Angaben von SMITH [36] bestimmt.
Wir verwendeten zu den Versuchen:

I. Substrat: 0,125 m Glycylglycin (Schuchardt, München)
(82,5 mg Glycylglycinpulver in 2,1 ml
0,1 n NaOH ad 5 ml auffüllen)
II. Puffer: 0,2 m Tris-Puffer pH 7,6.
III. Aktivator: 0,01 m $CoCl_2$.
IV. Gesättigte Pikrinsäure zur Unterbrechung der Fermentreaktion.

Standard-Ansätze:

1 ml Puffer
1 ml Substrat
0,25 ml Aktivator
15 min. inkubieren
0,25 ml Enzymlösung

Inkubationszeiten in der Regel: 10, 20, 30, 40, 50, 60 Minuten.
Die Inkubation erfolgte im Wasserbad bei 37° C.
Nach den einzelnen Inkubationszeiten wurden aus dem Ansatz 0,2 ml entnommen und in 10 ml gesättigte Pikrinsäure gegeben. Die Glycinbestimmung erfolgte mit der kolorimetrischen Ninhydrinmethode nach STEIN und MOORE [27].
Für die Messung werden die abgestoppten Ansätze filtriert und 0,2 ml davon mit 1 ml Ninhydrinreagenz versetzt. Diese Probe wird 15 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt, dann in kaltem Wasser abgekühlt und mit 5 ml 50 %igem Propanol verdünnt. Die Probe wird im Elko II bei Filter S 57/E 55 gegen einen 0-Wert photometriert. Die Hydrolysegrade können einer Eichkurve entnommen werden.

Verwendete Reagenzien:

I. Ninhydrin
II. Hydrindantin
Zur Herstellung des Hydrindantin werden 0,8 Gramm Ninhydrin in 20 ml Wasser bei 90° C im Wasserbad gelöst. Dazu gibt man 0,8 g Ascorbinsäure in 4 ml Wasser vorsichtig auf die stehende Ninhydrinlösung. Das Glas läßt man ruhig stehen und wartet die Kristallisation des Hydrindantin ab. Das ausgefallene Hydrindantin wird abfiltriert, gut ausgewaschen und im Exsikator un-

ter Verwendung von P_2O_5 als Trocknungsmittel im Dunkeln 24 h getrocknet.

III. Natriumacetat-Puffer pH 5,6.
27,2 g Natriumacetat · 3 H_2O werden in 20 ml Wasser gelöst und dann 5 ml Eisessig dazugegeben, mit dem pH-Meter wird pH 5,6 eingestellt.

IV. Cellosolve (Äthylenglykolminimethyläther)

Herstellung des Ninhydrin-Reagenzes

0,5 g Ninhydrin und 0,075 g Hydrindantin werden in 10 ml Cellosolve vorsichtig unter Rühren gelöst. Man gibt 6,2 ml Acetat-Puffer pH 5,6 dazu. In brauner Flasche im Dunkeln unter N aufbewahrt.

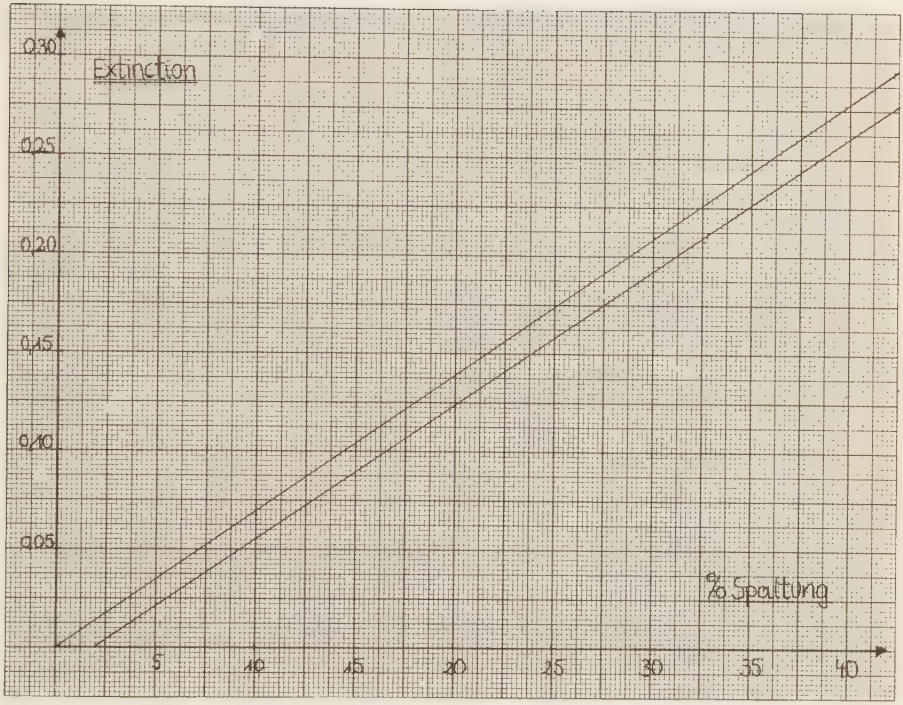
Eichkurve

Zur Herstellung einer Eichkurve wurde eine 0,001 m Diglycinlösung als Lösung A und eine 0,002 m Glycinlösung als Lösung B verwendet. Durch Mischen von Lösung A und B werden Verhältnisse geschaffen, die einer stufenweisen Spaltung der Diglycinlösung entsprechen.
Für die Eichkurven wurden folgende Zusammenstellungen verwendet:

Anteil-Lösung A		Anteil-Lösung B		% Spaltung
10 ml	+	0 ml	→	0
9,5 ml	+	0,5 ml	"	5
9 ml	+	1 ml	"	10
8,5 ml	+	1,5 ml	"	15
8 ml	+	2 ml	"	20
7,5 ml	+	2,5 ml	"	25
7 ml	+	3 ml	"	30
6,5 ml	+	3,5 ml	"	35
6 ml	+	4 ml	"	40

Von jeder der angegebenen Zusammenstellungen wurden 0,2 ml entnommen, mit 1 ml Ninhydrinreagenz versetzt, 15 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt, abgekühlt, mit 50 %igem Propanol verdünnt und im Elko II photometriert. Die gefundenen Extinctionen wurden in einem Ordinatensystem gegen die prozentuale Spaltung aufgetragen.

Eichkurve



Als Einheit der Dipeptidaseaktivität wurde nach SMITH[31] die Spaltung in Prozent pro Minute angenommen.
Unsere Angaben erfolgen in der spezifischen Aktivität, d.h.:
Spaltung in Prozent/Min./mg Stickstoff der Fermentlösung.

D BESTIMMUNG DER LAP-AKTIVITÄT

Zur Bestimmung der LAP-Aktivität verwendeten wir die BIOCHEMICA - TEST - COMBINATION - BOEHRINGER.

Prinzip des LAP-Testes

Das Enzym Leucinaminopeptidase katalysiert die Reaktion

L-Leucyl-β-naphthylamid + H_2O ⟶ Leucin + β-naphthylamin

Man bestimmt die Aktivität der Leucin-Aminopeptidase durch Messung der nach einer Stunde Inkubationszeit gebildeten Menge Naphthylamin. β-Naphthylamin wird mit Echtrot 3 Gl zu einem roten Diazofarbstoff gekuppelt. Dieser Farbstoff wird mit Essigsäureäthylester ausgeschüttelt und die Lösung photometriert. Die Anzahl der gebildeten γ β-Naphthylamin sind einer Eichkurve zu entnehmen. Die folgende Methode lehnt sich an die Angaben von GREEN[12] und BRAUN-FALCO[5] an.

Notwendige Reagenzien:

1.) Kaliumphosphat, prim. nach Sørensen
2.) Kaliumphosphat, sec. " "
3.) L - Leucyl-β-naphthylamid-hydrochlorid
4.) Echtrot 3 GL (Diazotiertes 3-Chlor-4-nitranilin)
5.) Perchlorsäure zum Enteiweißen (Merck Nr. 519)
6.) Essigsäureäthylester (Merck Nr. 864)
7.) β-Naphthylamin (Merck Nr. 6248)

Verwendete Lösungen:

1.) Puffer:
0,05 m Phosphatpuffer pH 7,2
2.) Substrat:
6,0 mg L-Leucyl-β-naphthylamid-hydrochlorid / ml.
3.) Chromogen:
20 mg Echtrot 3 GL in 20 ml bidestilliertem H_2O.
4.) β-Naphthylamin-Lösung für Eichkurve:
0,20 mg β-Naphthylamin / ml Alkohol 96 %.
5.) Perchlorsäure: ca. 6 %ig.
5 ml 70 %ige Perchlorsäure mit bidestilliertem Wasser ad 100 ml verdünnen.
6.) LAP - Reagenz:
2,5 ml Substrat + 50 ml Puffer ad 75 ml (mit Aquabidestillata).

Standard-Ansatz:

Zu jeder Versuchsreihe ist ein Leerwert von Fermentlösung anzusetzen, um geringe durch unkatalysierte Spaltung des Substrates entstehende Mengen β-Naphthylamine auszuscheiden.

Hauptwert:	Leerwert:
2,50 ml LAP-Reagenz	2,50 ml LAP-Reagenz
0,5 ml Enzym	-,--

Die Röhrchen durch Umschwenken mischen und in thermokonstantes Wasserbad von 37° C stellen. Nach 1 Stunde Inkubation

2,50 ml Perchlorsäure	2,50 ml Perchlorsäure

zugeben, gut mischen und 5 Minuten bei 3000 U/min zentrifugieren. Vom Überstand der zentrifugierten Probe bzw. vom Leerwert-Ansatz in je ein 10 ml-Zentrifugenglas pipettieren:

1,00 ml Überstand	1,00 ml Leerwertlösung
1,00 ml Chromogen	1,00 ml Chromogen.

Durch leichtes Umschwenken mischen und 10 Minuten bei Zimmertemperatur stehen lassen, dann

5,00 ml Essigsäureäthylester in Haupt- und Leerwert geben,
mit einem Korkstopfen (kein Gummi) verschließen, eine Minute kräftig schütteln und die verschlossenen Röhrchen ca. 3 Minuten bei 3000 U/min zentrifugieren. Dann die überstehende rotgefärbe Lösung in eine trockene oder mit Alkohol ausgespülte Küvette bringen und gegen den Leerwert photometrieren.
Wir verwendeten im Elko II Filter S 49/E 54.
Für die gemessene Extinktion die zugehörigen γ β-Naphthylamin aus der Eichkurve entnehmen.

Eichkurve:

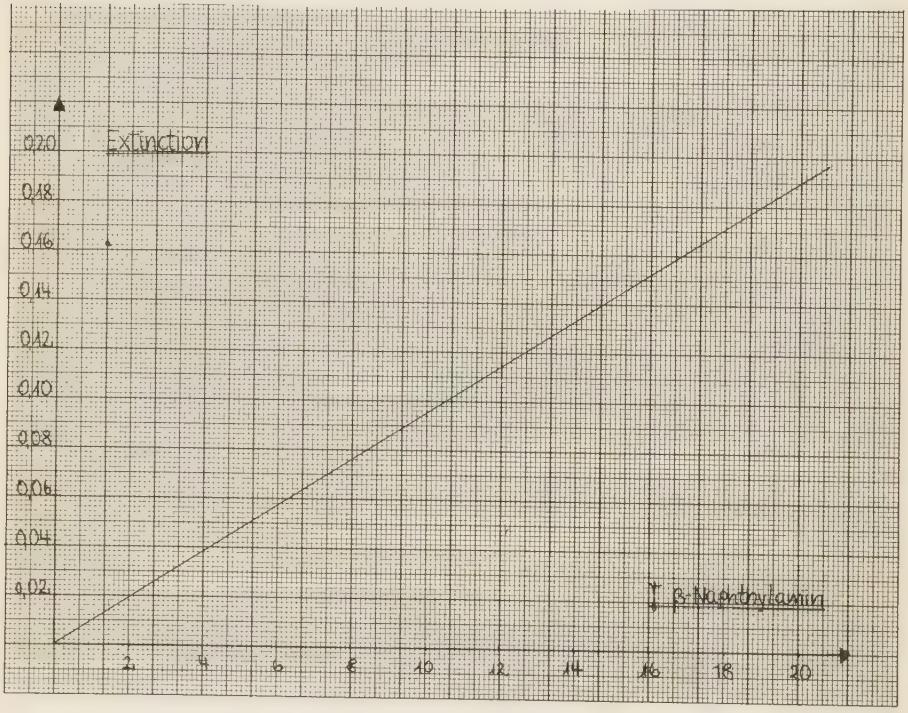
Nacheinander in 10 ml-Zentrifugengläser pipettieren:
0,50 ml bidestilliertes Wasser
0,05 bzw. 0,10 ml β-Naphthylaminlösung (=10 bzw. 20 γ β-Naphthylamin)
0,50 ml Perchlorsäure
1,00 ml Chromogen (frisch bereitet)
Leerwert ohne β-Naphthylamin ansetzen.
Durch leichtes Umschwenken mischen und 10 Minuten bei Zimmertemperatur stehen lassen, dann

5,00 ml Essigsäureäthylester

zugeben, mit einem Korkstopfen (kein Gummistopfen) verschließen,
1 Minute kräftig schütteln und die verschlossenen Röhrchen ca.
3 Minuten bei 3000 U/min zentrifugieren. Die überstehende, rotgefärbte Lö-

sung in eine trockene oder mit Alkohol ausgespülte Küvette bringen und bei Filter S 49/E 54 gegen den Leerwert photometrieren.
Die gefundenen Extinktionen auf mm-Papier gegen die eingesetzten Mengen β-Naphthylamin (10 und 20γ) eintragen und Eichkurve zeichnen.

Eichkurve:



Berechnung:

Wir geben die Aktivität der LAP wie folgt an:
Freigesetzte γ β-Naphthylamin/mg N/h. (=LAP - Einheit)

IV. ERGEBNISSE

1. DIPEPTIDASEAKTIVITÄT

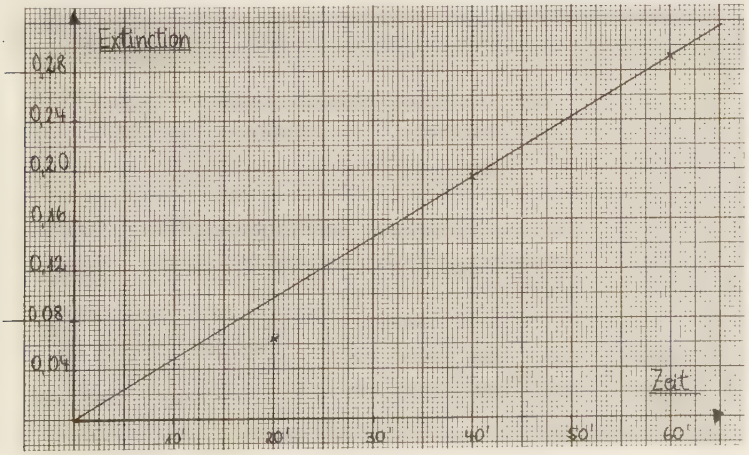
Um die Dipeptidaseaktivität zu bestimmen, haben wir von drei gleichen Fermentansätzen je einen nach zwanzig, vierzig und sechzig Minuten unterbrochen und die gefundenen Extinktionen in ein Ordinatensystem eingetragen, um zu kontrollieren, ob der Reaktionsverlauf linear ist. Aus den drei Einzelwerten wurde der Mittelwert berechnet und in einer Tabelle angegeben. Zwei Beispiele sollen veranschaulichen, wie die Ergebnisse gewonnen wurden.

1. Patientin Maria L., 49 Jahre
Diagnose: Adenocarcinoma ovarii, 3 Monate Amenorrhoe
Gewebe: 30,3 gr
Stickstoff: 1,368 mg N/ml Ho.

Gemessene Extinctionen bei Verdünnung 1 : 5 des Ho.

t	Ext.	% Sp.	% Sp/min	% Sp/min/mg N
20'	0,062	9	0,45	6,6
40'	0,195	28,4	0,71	10,4
60'	0,291	42,8	0,71	10,4

Der Mittelwert beträgt 9,1 %Sp/min/mg N.

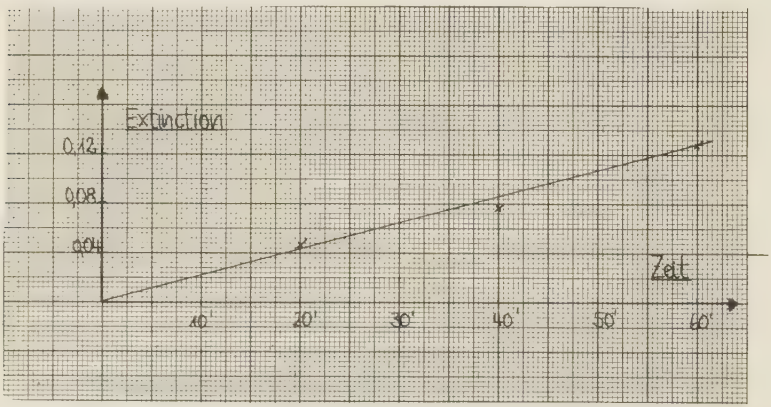


2. Patientin Maria N., 51 Jahre
Diagnose: Rezidivierende klimakterische Blutungen,
klimakterisches Ovar.
Gewebe: 2,8 gr
Stickstoff: 2,970 mg N/ml Ho.

Gemessene Extinctionen bei Verdünnung 1 : 5 des Ho.

t	Ext.	% Sp.	% Sp/min	% Sp/min/mg N
20'	0,043	6,3	0,325	2,084
40'	0,076	11,0	0,275	1,850
60'	0,126	17,2	0,295	2,00

Der Mittelwert beträgt: 1,99 % Sp/min/mg N.



DIPEPTIDASE IM SCHWEINEOVAR

Um Ergebnisse von JUNG und BEHROUZI [15] zu ergänzen und um mit der Methode der Fermentuntersuchung vertraut zu werden, haben wir zunächst Schweineovarien untersucht.
Die höchste Aktivität fanden wir im Gesamtovar mit Corpus luteum und rubrum. Das entspricht den Ergebnissen von BEHROUZI, der im Corpus luteum die höchste Aktivität fand (3,54 ± 0,64 % Sp/min/mg N).

Tabelle 1: Dipeptidase im Schweineovar

Gesamtovar mit kleinen Follikeln:	2,45 % Sp/min/mg N
Gesamtovar mit Corp. rub. und lut.:	3,78 % Sp/min/mg N
Gesamtovar (unsortiert):	3,39 % Sp/min/mg N

Als nächstes wurde die Enzymaktivität im Liquor folliculi untersucht. Dabei haben wir alle Follikel gemeinsam punktiert und keine getrennte Untersuchung von großen, mittleren und kleinen Follikeln durchgeführt. JUNG und HELD [16] berichten über eine höhere Fermentaktivität in kleinen Follikeln als in großen, so daß es nahe liegt, den Unterschied in den Ergebnissen unserer Versuche auf die ungleiche Verteilung der verwendeten Follikel zurückzuführen.

Tabelle 2: Dipeptidase im Liquor folliculi

Follikelflüssigkeit:	0,76 % Sp/min/mg N
"	0,62 "
"	0,59 "

Der Mittelwert beträgt 0,66 + - 0,09 % Sp/min/mg N.

DIPEPTIDASE IM MENSCHLICHEN OVAR

Es war uns möglich, menschliche Ovarien in verschiedenen Funktionszuständen zu untersuchen. Diese wurden durch Operation gewonnen und sofort nach der Entnahme auf ihre Fermentaktivität geprüft.
Wir konnten die Ovarien auf Grund klinischer Diagnose und histologischer Untersuchung in folgende Gruppen einteilen:

1. a) Ovarien von Frauen vor dem Klimakterium
   b) Ovarien von Frauen in der Menopause
   c) Ovarialcarcinome
   d) Granulosazelltumoren
   e) Ovarien mit anderen pathologischen Befunden
2. Corpus luteum

Zunächst folgende Ergebnisse in Tabellen zusammengefaßt:

Tabelle 3: Dipeptidase im menschlichen Ovar

Name	Diagnose	% Sp/min/mg N
Paula M. 44 J.	Uterusmyomatosus regelmäßige Periode, Proliferation	1,25
Auguste R. 42 J.	Uterus myomatosus Proliferation	1,30
Luise N. 41 J.	Uterus myomatosus 28. Tag des Cyclus	1,38

Der Mittelwert dieser drei Untersuchungen beträgt
1,31 ± 0,09 % Sp/min/mg N.

Tabelle 4: Dipeptidase im Ovar nach der Menopause

Name	Diagnose	% Sp/min/mg N
Maria F. 54 J.	Uterussarkom	2,36
Maria S. 54 J.	Adenocarcinoma uteri	2,47
Rosine H. 47 J.	Uterus myomatosus	2,83

Der Mittelwert der Dipeptidaseaktivität der Ovarien von Frauen nach der Menopause beträgt 2,55 % Sp/min/mg N. Sie ist damit rund 84 % höher als die der normalen Eierstöcke.

Tabelle 5: Dipeptidaseaktivität in carcinomatösen Ovarien

Name	Diagnose	% Sp/min/mg N
Maria L. . 49 J.	Adenocarcinoma ovarii 3 Monate Amenorrhoe	9,1
Erika K. 27 J.	Papillär entartetes Cystoma ovarii 28. Tag des Cyclus	2,54
Therese F. 56 J.	Cystoma ovarii Menopause	2,01

Es muß diskutiert werden, ob es sich bei der hohen Aktivität im Fall Maria L. um die Wirkung des praeoperativ verabreichten Endoxan handelt. Dies ist naheliegend, da von SCHETTLER [30] bei Untersuchungen in unserem Labor eine höhere proteolytische Aktivität bei Endoxan-vorbehandelten Tumoren gegenüber nicht vorbehandelten gefunden wurde. Wir fanden ebenfalls eine Erhöhung der Dipeptidaseaktivität bei Endoxan-vorbehandeltem Granulosezelltumor, die aus der folgenden Tabelle zu ersehen ist.

Tabelle 6: Dipeptidaseaktivität in Granulosazelltumoren

Name	Diagnose	% Sp/min/mg N
Paula R. 53 J.	Granulosazelltumor Menopause	4,44
Emilia N. 48 J.	Granulosazelltumor Endoxan-behandelt Menopause	7,40

Wie schon oben erwähnt, fällt beim Vergleich dieser beiden Untersuchungen auf, daß das Endoxan-vorbehandelte Ovar auch hier eine um 2/3 gesteigerte Aktivität gegenüber dem nicht vorbehandelten Tumor aufweist.

Tabelle 7: Dipeptidaseaktivität in Ovarien mit anderen pathologischen Befunden

Name	Diagnose	% Sp/min/mg N
Anneliese K. 33 J.	Polycystisches Ovar 20. Tag des Cyclus	6,88
Doris K. 38 J.	Luteincysten bei Blasenmole Schwangerschaftsamenorrhoe	3,99

Als letzte Dipeptidaseuntersuchungen folgen die zweier Corpora lutea. Diese Ergebnisse lassen aber nur eine beschränkte Aussage zu. Weitere Versuche müssen zur Bestätigung der Richtigkeit folgen und klären, ob das Corpus luteum in Blüte tatsächlich eine über doppelt so hohe Aktivität aufweist wie das Corpus luteum in Regression.

Tabelle 8: Dipeptidase im menschlichen Corpus luteum

Name	Diagnose	% Sp/min/mg N
Frieda S. 42 J.	Uterus myomatosus Corpus luteum in Blüte	4,90
Auguste R. 42 J.	Uterus myomatosus Corpus luteum in Regression	1,86

ZUSAMMENFASSENDE BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die höchste Dipeptidaseaktivität wurde mit 9,1 % Sp/min/mg N im Endoxan-vorbehandelten Adenocarcinoma ovarii gefunden. Die Aktivität nimmt in folgender Reihenfolge ab:

Granulosazelltumor, Endoxan-behandelt:	7,40 % Sp/min/mg N
Polycystisches Ovar:	6,88 % Sp/min/mg N

Verschiedene andere pathologische Ovarialbefunde liegen dazwischen.

Ovarien der Menopause:	2,41 % Sp/min/mg N
Menschliche Ovarien:	1,31 % Sp/min/mg N

Es fällt auf, daß der mit Endoxan-behandelte Granulosazelltumor eine um 60 % gesteigerte Aktivität gegenüber dem nicht behandelten aufweist, der seinerseits im Vergleich zum gesunden klimakterischen Ovar eine zweimal höhere Aktivität hat. Die Aktivität des polycystischen Ovars ist im Vergleich zu dem entsprechenden gesunden ca. fünfmal, die des Schwangerschaftsovars mit Luteincysten dreimal höher.
Im Corpus luteum in Blüte ist die Dipeptidaseaktivität dreimal höher als im menschlichen Ovar. Sie beträgt 4,90 % Sp/min/mg N und ist damit auch 2,5mal höher als die des Corpus luteum in Regression, die nur 1,86 % Sp/min/mg N beträgt. Dies läßt Rückschlüsse auf die Ergebnisse FUHRMANNs [7] zu, der im Endometrium des menschlichen Uterus während der Sekretion ebenfalls eine ca. dreimal höhere Aktivität der Dipeptidase als in der Proliferation fand.
Die Aktivität des Schweineovars ist mit 2,45-3,38 % /Sp/min/mg N rund doppelt so hoch wie die des menschlichen Ovars. Das entspricht Ergebnissen von JUNG [18] und Mitarbeiter bei Endopeptidasen, da diese im Schweineovar auch eine höhere Kathepsinaktivität als im menschlichen Ovar fanden.

II. LEUCINAMINOPEPTIDASEAKTIVITÄT

Als weiteres Enzym haben wir die LAP im Ovar untersucht, und zwar zunächst wieder im Schweineovar, dann im menschlichen Ovar.

1a) In der Follikelflüssigkeit des Schweineovars

Wir haben große, mittlere und kleine Follikel getrennt untersucht und die Ergebnisse mit der Aktivität der Gesamtfollikelflüssigkeit verglichen. Dabei waren Follikel über 8 mm Durchmesser als große, unter 3 mm Durchmesser als kleine eingeteilt. Dazwischen lagen die mittleren Follikel. Eine feinere Unterscheidung war makroskopisch nicht möglich.
Die höchste Aktivität fanden wir in der Flüssigkeit der kleinen, die geringste in der der großen Follikel, wie dies auch bei Dipeptidase, Kathepsin, saurer und alkalischer Phosphatase und Adenosintriphosphatase der Fall ist.

Tabelle 9: LAP-Aktivität im Liquor folliculi des Schweines

Gesamtfollikelflüssigkeit	14,7 γ β -NA/mg N/h	100 %
Flüssigkeit kleiner Follikel	21,0 " "	143 %
Flüssigkeit mittlerer Follikel	13,0 " "	88 %
Flüssigkeit großer Follikel	10,0 " "	68 %

1b) Im Corpus rubrum und luteum des Schweines

Bei diesen Bestimmungen fanden wir im Corpus luteum eine höhere LAP-Aktivität als im Corpus rubrum. Wieviel Prozent die Aktivitätssteigerung beträgt, läßt sich leider nicht genau sagen, weil die makroskopische Unterscheidung von Corpora rubra und lutea nicht ausreichend genau ist. Eine mikroskopische Untersuchung jedes Organs ist aus technischen Gründen jedoch nicht möglich.

Tabelle 10: LAP-Aktivität im Corpus rubrum und luteum des Schweines

Corpus rubrum	Corpus luteum
344 γ β -NA/mg N/h	740 γ β -NA/mg N/h
467 " "	537 " "

Die LAP-Aktivität im Corpus luteum war bei unseren Versuchen immer höher als im Corpus rubrum. Damit entspricht sie dem Verhältnis des Kathepsin, von dem sowohl im Corpus rubrum des Menschen wie des Schweines eine niederere Aktivität gemessen wurde als im Corpus luteum.

1c) Spezifische Aktivität der LAP in Zellfraktionen des Schweineovars

Um die Ergebnisse der Fraktionierung mit den übrigen vergleichen zu können, geben wir in folgender Tabelle die spezifische LAP-Aktivität der einzelnen Fraktionen der Zelle des Schweineovars an.

Tabelle 11: Spezifische LAP-Aktivität der Schweineovarfraktionen

Fraktion	1. Untersuchung	2. Untersuchung
Homogenat	226 γ β-NA/mg N/h	231 γ β-NA/mg N/h
Zellkerne	202 "	118 "
Mitochondrien	365 "	404 "
Cytoplasma und Mikrosomen	118 "	168 "

Die höchste spezifische Aktivität finden wir in der Mitochondrienfraktion mit einem Mittelwert von 385 ± 26 γ β-NA/mg N/h. Die Aktivität des Gesamtovars beträgt 228 ± 3,5 γ β-NA/mg N/h, die der Zellkerne und Cytoplasma-Mikrosomenfraktion liegen erheblich darunter.

In der folgenden Tabelle ist die prozentuale Verteilung des Gesamt-N der der LAP-Aktivität gegenübergestellt.

Tabelle 12a: prozentuale Verteilung des Gesamt-N und der LAP-Aktivität in der Zelle des Schweineovars

Zellfraktion	N-Gehalt		LAP-Aktivität	
	mgN	% des Homogenates	γ β-NA/h -	% des Homogenates
1 ml Homogenat 1:3 in 30%iger Rohrzuckerlösung daraus gewonnen:	3,937	100	890	100
Zellkerne	0,183	4,7	37	4,1
Mitochondrien	0,561	14,1	210	25,2
Cytoplasma und Mikrosomen	3,710	93,2	437	49
	4,454	112,0	684	78,3

Sowohl bei dieser als auch bei der folgenden Fraktionierung gingen rund 20 % der Aktivität verloren, ohne daß wir bislang dafür eine Erklärung finden konnten.

Tabelle 12b: Prozentuale Verteilung des Gesamt-N und der LAP-Aktivität in der Zelle des Schweineovars

2. Untersuchung

Zellfraktion	N-Gehalt		LAP-Aktivität	
	mgN	% des Homogenates	γ β-NA/h	% des Homogenates
1 ml Homogenat 1:3 in 30%iger Rohrzuckerlösung Daraus gewonnen:	3,724	100	860	100
Zellkerne	0,264	7,1	31	3,6
Mitochondrien	0,362	9,7	146	17
Cytoplasma und Mikrosomen	3,270	87,6	550	64
	3,896	104,4	727	84,6

2. Leucinaminopeptidaseaktivität in menschlichen Gewebe

1a) LAP-Aktivität im nicht pathologisch veränderten Ovar:

Wir haben drei Ovarien in verschiedenen Funktionszuständen untersucht. Die höchste LAP-Aktivität fanden wir im Ovar von Frauen im Klimakterium und der Menopause. Sie beträgt 470 und 420 γ β -NA/mg N/h. Im Ovar einer fertilen Frau fanden wir nur eine Aktivität von 30 γ β -NA/mg N/h.

Tabelle 13: LAP-Aktivität im gesunden Ovar

Name	Diagnose	γ β-NA/mg N/h
Maria S. 54 J.	Adenoca.corp.ut. 5 J. Menopause	420
Gertraud H. 50 J.	Uterus myomatosus unregelmäßige Periode	470
Auguste R. 42 J.	Uterus myomatosus frühe Proliferation	30

1b) LAP-Aktivität im Ovar bei verschiedenen pathologischen Befunden

Von verschiedenen pathologisch veränderten Ovarien zeigte das Adenocarcinoma ovarii die größte Aktivität. Sie beträgt 240 γ β -NA/mg N/h und ist damit nur etwa halb so hoch, wie die Aktivität des klimakterischen Ovars.

In einem Ovar mit Granulosazelltumor fanden wir die LAP-Aktivität von 130 γ β -NA/mg N/h. Das ist nur ein Drittel der Aktivität des entsprechenden gesunden Ovars aus der Menopause. Polycystisch veränderte Ovarien fertiler Frauen weisen gegenüber dem gesunden Ovar eine leichte Aktivitätssteigerung auf. Bei diesem Vergleich muß berücksichtigt werden, daß wir nur ein Ovar einer fertilen Frau untersuchen konnten.

Tabelle 14: LAP-Aktivität bei pathologischen Ovarialbefunden

Name	Diagnose	γ β-NA/mg N/h
Maria L. 49 J.	Adenocarcinoma ovarii 3 Mon. Amenorrhoe	240
Paula R. 53 J.	Granulosazelltumor, Menopause	130
Annel. N. 33 J.	Polycyst. Ovar, Meno-Metro- rrhagien, 20. Tag d. Cyclus	52
Paula N. 44 J.	Cystische Ovarien Proliferation	61

1c) LAP-Aktivität im Schwangerschaftsovar

Die LAP-Aktivität im normalen Schwangerschaftsovar beträgt 55 γ β-NA/mg N/h. Diese Aktivität unterscheidet sich nicht wesentlich von der des Ovars fertiler Frauen.
Auffallend niedrig ist die LAP-Aktivität des Schwangerschaftsovars mit Luteincysten bei Blasenmole. Sie beträgt nur 2,5 γ β-NA/mg N/h.

Tabelle 15: LAP-Aktivität im Schwangerschaftsovar

Name	Diagnose	γ β-NA/mg N/h
Maria P. 42 J.	Verhornendes Platten- epithelca. colli	55
Doris K. 37 J.	Luteincysten bei Blasenmole	2,5

1d) LAP-Aktivität in den Fraktionen des carcinomatösen Ovars

Zur Herstellung von Fraktionen benötigt man etwa 10 - 15 g Frischgewebe. Soviel Gewebe von einer Patientin konnten wir nur einmal erhalten. Dabei handelt es sich um carcinomatös entartete Ovarien einer 49 jährigen Frau. 30,3 g Frischgewebe wurden mit 30 %iger Rohrzuckerlösung homogenisiert und ergaben 48 ml Homogenat.

Tabelle 16: LAP-Aktivität und Gesamt-N in ihrer prozentualen Verteilung in der Zelle des carcinomatösen Ovars

Fraktion	N-Gehalt		LAP-Aktivität in	
	mgN	%	γ β-NA/h	%
1 ml Homogenat 1:3 in 30%iger Rohrzuckerlösung enthält	1,148	100	317	100
daraus gewonnen in Zellkernen	0,202	17,7	81	25,7
Mitochondrien	0,481	42,0	77	24,4
Cytoplasma und Mikrosomen	0,338	29,5	0	0
	1,021	89,2%	158	50,1%

Tabelle der spezifischen LAP-Aktivität in den Fraktionen des menschlichen Ovars

Fraktion	γ β-NA/mg N/h
Homogenat	274
Zellkerne	405
Mitochondrien	160
Cytoplasma und Mikrosomen	0

Der große Verlust der LAP-Aktivität liegt vor allem daran, daß wir in der Cytoplasma-Mikrosomenfraktion keine Aktivität mehr nachweisen konnten, weil bei der Fraktionierung diese Fraktion zu sehr verdünnt wurde. Es fand sich zwar eine leichte farbliche Veränderung, die aber nicht ausreichte, um eine Extinction zu messen.
Bemerkenswert scheint uns, daß im carcinomatösen Ovar die höchste spezifische LAP-Aktivität in den Zellkernen gefunden wird.

2.) LAP im menschlichen Corpus luteum

Wir haben drei menschliche Corpora lutea in verschiedenen Funktionszuständen untersucht. Dabei war die LAP-Aktivität des Corpus luteum in Blütenzustand mit 140 γ β-NA/mg N/h am größten.

Tabelle 17: LAP-Aktivität im menschlichen Corpus luteum

Name	Diagnose	γ β-NA/mg N/h
Frieda S. 42 J.	Uterus myomatosus Corp. lut. in Blüte (9-10 Tage)	140
Auguste R. 42 J.	Uterus myomatosus Corp. lut. der Proliferations-phase	131
Luise N. 41 J.	Uterus myomatosus 28. Tag der Periode	65,5

ZUSAMMENFASENDE BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die höchste LAP-Aktivität fanden wir im Corpus luteum des Schweines mit 740 LAP-Einheiten. Dagegen beträgt die Aktivität des menschlichen Gelbkörpers in Blüte nur 140 LAP-Einheiten.
Die LAP-Aktivität des Schweineovars hat im Mittel eine Höhe von 228 LAP-Einheiten.
Beim Menschen ist die Aktivität im klimakterischen Ovar am höchsten mit 420 LAP- Einheiten.
Im Adenocarcinoma ovarii fanden wir 240, bei Granulosazelltumor 130, bei polycystischem Ovar 52 und 61 γ β-NA/mg N/h. Die Aktivität der LAP im gesunden Ovar der Proliferationsphase beträgt 30 LAP-Einheiten. Damit weist das Schweineovar eine 7 mal höhere Aktivität als das menschliche Ovar auf.
Die Fraktionierung des Schweineovars ergab die höchste spezifische Aktivität in der Mitochondrienfraktion bei einem N-Gehalt von 14,1 % finden wir in ihr 25,2 % der Gesamtaktivität.
Im menschlichen carcinomatösen Ovar weist die Zellkernfraktion die höchste Aktivität auf.

V. DISKUSSION

Wir haben die Aktivität zweier Exopeptidasen im Ovargewebe untersucht. Sowohl die Glycylglycin-Dipeptidase als auch die Leucinaminopeptidase (LAP) konnten im tierischen und menschlichen Eierstock nachgewiesen werden.

Die höchste Glycylglycin-Dipeptidase-Aktivität fanden wir mit 9,10 % Sp/min/mg N im Endoxan-behandelten Adenocarcinoma ovarii. Im Schweineovar beträgt die Glycylglycin-Dipeptidase-Aktivität 3,21 % Sp/min/mg N, im Ovar von Frauen nach der Menopause 2,41 % Sp/min/mg N und im fertilen Ovar nur 1,31 % Sp/min/mg N eine wesentlich höhere Glycylglycindipeptidaseaktivität auf als das menschliche Gesamtovar oder das Corpus luteum in Regression,das nur 1,86 % Sp/min/mg N hat.
Im Gelbkörper des Schweines konnte JUNG [18] und Mitarbeiter eine Spaltung von 3,54 % Sp/min/mg N nachweisen. Erwähnenswert ist die Aktivitätssteigerung der Glycylglycindipeptidase des mit Endoxan vorbehandelten Granulosazelltumor auf 7,40 % Sp/min/mg N gegenüber dem nicht vorbehandelten mit nur 4,44 % Sp/min/mg N. Der nicht vorbehandelte Granulosazelltumor zeigt gegenüber dem gesunden Ovar nach der Menopause eine Aktivitätssteigerung von 83 %. FUHRMANN [7] berichtet über eine Dipeptidaseaktivität des Endometriums in der Sekretionsphase von 2,06 % Sp/min/mg N. Dieser Wert liegt etwa in der selben Größenordnung wie die von uns gefundenen für das Schweineovar und den menschlichen Eierstock.

Die Dipeptidaseaktivität des Liquor folliculi des Schweines ist mit 0,66 % Sp/min/mg N die niedrigste von uns gemessene Aktivität.
Wir können auf Grund dieser Ergebnisse annehmen, daß im Ovar und Corpus luteum des Menschen keine spezifische Funktion für die Glycylglycindipeptidase vorhanden ist, da diese gegenüber anderen Geweben keinen Unterschied in der Aktivität aufweist.
Wie schon erwähnt, fand sich die höchste LAP-Aktivität im Corpus luteum des Schweines mit 740 Einheiten. Die Aktivität des menschlichen Corpus luteum in Blüte beträgt dagegen nur 140 Einheiten, also rund 1/5.
Auch bei anderen proteolytischen Enzymen wurde ein etwa gleiches Verhältnis der Aktivität im tierischen und menschlichen Corpus luteum von JUNG und Mitarbeitern [18] nachgewiesen. Dagegen hat das Corpus rubrum im Vergleich zum Corpus luteum eine höhere LAP-Aktivität als Kathepsinaktivität, denn im Corpus rubrum des Schweines findet sich mit 405 Einheiten die halbe LAP-Aktivität des Corpus luteum, aber immer noch eine höhere Aktivität als

die des Gesamt-Schweineovars mit 228 Einheiten. Im Gelbkörper des Schweines wiesen JUNG und G. KIDES [14] eine Kathepsinaktivität nach, die 10 mal höher ist, als die des Corpus rubrum.
Die LAP-Aktivität des menschlichen Ovars beträgt in der Menopause 450, im funktionstüchtigen Ovar dagegen nur 30, die LAP-Aktivität des menschlichen Corpus luteum liegt mit 140 dazwischen.
Das Verhältnis der LAP-Aktivität im menschlichen Corpus luteum zu der im fertilen Ovar entspricht etwa dem Verhältnis des Kathepsins und der Dipeptidase. Es ist nämlich die Aktivität des Gesamtovars geringer als die des Corpus luteum. Auffällig ist aber, daß das ruhende Ovar der Menopause eine über 10 mal so hohe LAP-Aktivität zeigt wie das fertile Ovar.

Im Gegensatz zur Dipeptidase fanden wir die LAP bei pathologisch veränderten Ovarien, z.B. beim ENDOXAN-behandelten Adenocarcinoma ovarii mit 240 Einheiten nur etwa halb so hoch wie die des klimakterischen Ovars, bei Granulosazelltumor sogar nur 1/3.
Im nicht pathologisch veränderten Schwangerschaftsovar beträgt die LAP-Aktivität 55 Einheiten und unterscheidet sich damit nicht wesentlich von der des Ovars fertiler Frauen.
Die Aktivität der LAP im Liquor folliculi des Schweines zeigt einen deutlichen Unterschied bei großen und kleinen Follikeln. Die Aktivität großer Follikel beträgt 10, die kleiner 21.
JUNG und SCHMID [17] konnten in kleinen Follikeln eine ebenfalls höhere Kathepsin-, saure und alkalische Phosphatase- und Adenosintriphosphataseaktivität feststellen.
In der Zelle des Schweineovars fanden wir die höchste spezifische LAP-Aktivität in der Mitochondrienfraktion. Demgegenüber zeigt sich bei der Fraktionierung des ENDOXAN-vorbehandelten carcinomatösen Ovars in den Zellkernen eine erheblich höhere spezifische LAP-Aktivität als in den Mitochondrien. Die höchste spezifische Kathepsinaktivität wurde von JUNG ebenfalls in den Mitochondrien des Schweineovars nachgewiesen. Die saure Phosphatase hat in Homogenat, Mitochondrien und Cytoplasma-Mikrosomenfraktion etwa die gleiche spezifische Aktivität, während die alkalische Phosphatase in der Mitochondrienfraktion die höchste spezifische Aktivität aufweist (17).
Beim Vergleich der Dipeptidase-, LAP- und der von JUNG [18] bestimmten Kathepsinaktivität im Ovargewebe kann man folgendes zusammenfassen:

1. Die höchste Aktivität aller drei Enzyme finden wir im Corpus luteum, nur die LAP-Aktivität des klimakterischen Ovars, die fast 15 mal höher ist als die des fertilen Ovars, ist mehr als 3 mal so hoch wie die LAP-Aktivität des menschlichen Corpus luteum.

2. Im Corpus rubrum ist die Aktivität der LAP höher als im Gesamtovar, während die Kathepsinaktivität im Gesamtovar höher ist als im Corpus rubrum.

3. Im Schweineovar ist die Dipeptidase-Aktivität rund doppelt so hoch wie im menschlichen Ovar, die Kathepsinaktivität 5 mal so hoch, die LAP fast 10 mal so hoch wie im fertilen menschlichen Eierstock.

4. Die Dipeptidaseaktivität im Liquor folliculi des Schweines beträgt nur 0,66 % Sp/min/mg N, und auch die LAP-Aktivität mit 14,7 Einheiten ist sehr niedrig.

Auf Grund dieser Ergebnisse muß angenommen werden, daß einzelne der von uns untersuchten Enzyme des Eiweiß - Stoffwechsels nicht nur eine Aufgabe im normalen Zellstoffwechsel zur Erhaltung der Funktionstüchtigkeit der Zelle haben. Vielmehr weisen die Unterschiede in der Aktivität der untersuchten Enzyme darauf hin, daß ihnen eine spezifische Aufgabe in den verschiedenen Funktionsstufen des Ovars im Laufe des Lebens zuzuordnen ist. Dies wird vor allem dadurch unterstützt, daß pathologisch veränderte Ovarien die Aktivität der einzelnen Enzyme verschieden verändern [19].

Die von uns gefundenen Ergebnisse konnten vor allem für das fertile menschliche Ovar nur in einigen wenigen Fällen festgestellt werden. Es ist deshalb unbedingt erforderlich, durch weitere Untersuchungen von gesunden fertilen menschlichen Ovarien, die allerdings nur in Ausnahmefällen zur Verfügung stehen, die Beweiskraft unserer Untersuchungsergebnisse zu festigen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Glycylglycindipeptidase und die Leucinaminopeptidase (LAP) im Eierstock des Menschen und des Schweines untersucht. Die Organe wurden nach der Methode von LANG und SIEBERT aufgearbeitet.

Die wichtigsten Ergebnisse folgen hier nochmals.
Die Dipeptidaseaktivität des Schweineovars beträgt 3,21 % Sp/min/mg N, die des menschlichen präklimakterischen Ovars 1,31 % Sp/min/mg N. Im klimakterischen Ovar ist sie dagegen 2,41 % Sp/min/mg N.
Die höchste Dipeptidaseaktivität mit 9,1 % Sp/min/mg N ließ sich im Endoxan-vorbehandelten Adenocarcinom des Ovars nachweisen.

Die Dipeptidaseaktivität des Corpus luteum ist sowohl beim Menschen als auch beim Schwein höher als die des Ovars.
Die LAP-Aktivität des menschlichen klimakterischen Ovars beträgt 420 LAP-Einheiten, die des Corpus luteum dagegen nur 140 LAP-Einheiten und die des gesunden Ovars sogar nur 30 LAP-Einheiten. Dagegen beträgt die LAP-Aktivität des Schweineovars 228 LAP-Einheiten, und die des Corpus luteum des Schweines ist mit 740 LAP-Einheiten die höchste nachgewiesene LAP-Aktivität überhaupt.

Die Fraktionierung des Schweineovars ergab die höchste LAP-Aktivität in der Mitochondrienfraktion. Im menschlichen carcinomatösen Ovar weist die Zellkernfraktion die höchste Aktivität auf.

Diskutiert wird, ob für die Dipeptidase und die Leucinaminopeptidase im menschlichen Ovar eine besondere Funktion anzunehmen ist.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. ABDERHALDEN, R.: Das Vorkommen von Polypeptidasen in der Milch. Fermentforschung, 15, 302 (1937).

2. BERGMANN, M.: A classification of proteolytic enzymes. Adv. Enzymol. 2, 49 (1942).

3. BRAUN-FALCO, O. u. K. SALFELD: Über das Verhalten der LAP-Aktivität im Blutserum und Blaseninhalt. Arch. Klin. exp. Derm. 205, 103 (1957).

4. BRAUN-FALCO, O., K. SALFELD und F. BRAUN-FALCO: Über das Verhalten der LAP-Aktivität im Blutserum bei Patienten mit malignen Tumoren im Mund- und Halsbereich, Klin. Wochenschrift 37, 231 (1959).

5. BRAUN-FALCO, O. u. K. SALFELD: Über das Verhalten der LAP-Aktivität im Blutserum und Blaseninhalt. 1. Mitteilung: Untersuchung an Hautgesunden. Arch. klin. exp. Derm 204, 407 (1957).

6. FLEISHER, G. A., H. R. BUTT und K. A. HUIZENGA: Enzymatic hydrolysis of l-leucylglycine in serum in hepatic disease. Proc. Mayo Clin. 32, 410 (1957).

7. FUHRMANN, K.: Über die Eiweiß-spaltenden Fermente der weiblichen Genitalorgane unter besonderer Berücksichtigung des Endometriums. Habil. Schrift Erlangen 1958.

8. GÖGGEL, K. H., CREUTZFELD, W. und J. MURUCAS: Das Verhalten der LAP und anderer Enzyme im Serum bei Leber-, Gallen- und Pakreaserkrankungen. Dtsch. Med. Wschr. 85, 1756 u. 1808 (1960).

9. GOLDBARG, J.A. und A.M.RUTENBURG: The Colorimetric Determination of Leucine-Aminopeptidase in Urine and Serum of Normal Subjects and Patients with Cancer and other Diseases. Cancer 2, 283 (1958).

10. GRASSMANN, W., W. HEYDE und H. DYKERHOFF: Zitiert nach B.FLASCHENTRÄGER und E. LEHNARTZ, Physiologische Chemie, Band 1, 1132 ff. (1951). Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg.

11. GRASSMANN, W. und L.KLENK: Zitiert nach B.FLASCHENTRÄGER und E.LEHNARTZ, Physiologische Chemie, Band 1, 1132 ff. (1951). Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg.

12. GREEN, M.N., K.Ch. TSOU, R.BRESSLER und A.M.SELIGMAN: Die kolorimetrische Bestimmung der LAP-Aktivität mit l-Leucyl-β-naphthylamid-hydrochlorid. Arch.Biochem.Biophys. 57, 485 (1955).

13. JONSON, M.J., H.G.JOHNSON und W.PETERSON: The Magnesiumactivated Leucyl-Peptidase of Animal Erepsin. J.biol.chem. 116, 515 (1936).

14. JUNG, G.u.E.KIDES: Proteolytische Fermente im Ovargewebe. Arch.Gyn. 192, 151 (1959).

15. JUNG, G. und B.BEHROUZI: Unveröffentlicht.

16. JUNG, G. u. H.HELD: Über Fermente in der Follikelflüssigkeit. Arch.Gyn. 192, 146-150 (1959).

17. JUNG, G. und M.SCHMID: Phosphatasen im klimakterischen Ovar. In Vorbereitung.

18. JUNG, G.: Untersuchungen über proteolytische Enzyme des Ovariums.
Habilitationsschrift Tübingen 1962.

19. JUNG, G. und Mitarbeiter: Fermentuntersuchungen an pathologischen Ovarien.
Unveröffentlichter Vortrag auf der 129. Tagung der Mittelrheinischen Gesellschaft für Geburtshilfe und Gynäkologie. Mainz 1963.

20. KNOBLANCK, A. und W. LOEB: Über peptidspaltendes Enzym der Ovarien.
Biochem. Z. 29, 102 (1910).

21. LANG, K. und G. SIEBERT: Die Aufarbeitung von Geweben und Zellen.
In Hoppe-Seyler/Thierfelder: Handbuch der physiologischen und pathologisch-chemischen Analyse.
Bd. II, Teil 2, 537 (1955). Verlag Springer Berlin, Göttingen, Heidelberg.

22. LEHNARTZ, E.: Einführung in die Chemische Physiologie.
1, 280 (1959). Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg.

23. LINDERSTØM-LANG, K.: Über Darmerepsin.
Z. Physiol. Chem. 182, 151 (1929).

24. LOEB, W. und S. GUTMAN: Zur Kenntnis der Enzyme der Ovarien.
Biochem. Z. 41, 445 (1912).

25. MICHAELIS, X.: Physiologische Chemie, Lehr- u. Handbuch, Flaschenträger- Lehnartz.
Bd. 1, 1134 (1951). Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg.

26. MITTASCH, A.: Über katalytische Verursachung im biologischen Geschehen.
Berlin 1935.

27. MOORE, S. und W. H. STEIN: A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. J. biol. chem. 211, 907 (1954).

28. ROEMER, H.: Über das regelmäßige Auftreten einer spezifischen Protcinase während des mensuellen Zyclus. Klin. Wschr. 24/25, 116 (1946/47).

Die Kontrolle der Ovarialfunktion durch den Nachweis eines spezifischen proteolytischen Fermentes. Arch. Gyn. 186, 259 (1955).

29. RUTENBURG, A., GOLDBARG, A. und E. PINEDA: Leucine Aminopeptidase Activity. Observations in patients with cancer and other diseases. New Engl. J. Med. 259, 469 (1958).

30. SCHETTLER, G.: Untersuchungen über die Einwirkung verschiedener Zytostatika auf Proteinasen des Ovars. Inaug. Diss. Tübingen 1963.

31. SMITH, E.: The glycylglycine dipeptidase of sceletal muscle and human uterus. J. Biol. Chem. 173, 553 (1958).

32. SMITH, E. und R. LUMRY: Some consideration of the interaction of the metal peptidase with their substrates.

Cold Spring Harbour Symp. 14, 168 (1950).

33. SMITH, E.: The mode of action of the metal peptidases. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 35, 80 (1949).

34. SMITH, E. und D. SPACKMANN: Leucine Aminopeptidase. Activation, Specifity and Mechanism of Action. J. Biol. Chem. 212, 271 (1955).

35. SMITH, E. und M. BERGMANN: The activation of intestinal peptidase by manganese. J. Biol. Chem. 138, 789 (1941).

36. SMITH, E.: Dipeptidase. In Colowick, S. und N. Kaplan: Methods in Enzymology. Vol. II, New-York, Acad. Press, Inc., Publ. 1955.

37. SPACKMANN, D., E. SMITH und D. BROWN: Leucine Aminopeptidase. IV. Isolation. J. Biol. Chem. 212, 255 (1955).

38. SUMNER, J. und K. MYRBÄCK: The Enzymes. Chemistry and Mechanism of Action. New-York, Academic Press, Inc. 1950-52.

LEBENSLAUF

Am 3.Mai 1939 wurde ich als Tochter des praktischen Arztes Dr.Fritz Schwägerle und seiner Frau Anna, geborene Lemperle, in Tübingen geboren. Von 1945-1949 besuchte ich die Volksschule, dann bis zum Abitur, das ich im März 1958 bestand, das Kepler-Gymnasium in Tübingen. Im Mai 1958 begann ich ebenfalls in Tübingen mein Medizinstudium. Nach zwei Semestern legte ich das Vorphysikum, nach weiteren drei Semestern das Physikum in Tübingen ab. Mein erstes klinisches Semester hörte ich an der Universität in Innsbruck. Anschließend kehrte ich nach Tübingen zurück und studierte hier fünf klinische Semester. Am 10.Dezember 1963 bestand ich in Tübingen das Staatsexamen in Medizin.